

## STRUKTURNÍ BIOLOGIE V ANTIVIROVÉM VÝZKUMU NA PŘÍBĚŽÍCH KINAS LIPIDŮ, PROTEINU STING A VIROVÝCH METHYLTRANSFERAS

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

EVŽEN BOUŘA

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika  
boura@uochb.cas.cz

Došlo 30.10.23, přijato 20.11.23.

Tento článek se zaměřuje na roli strukturní biologie ve vývoji malých molekul, sloužících jako ligandy proteinů, které by mohly být v budoucnosti využity jako léky. Pro získávání strukturních informací o proteinech jsou využívány experimentální metody, které následně umožňují virtuální screening rozsáhlých knihoven látek. Nalezené ligandy jsou dále experimentálně ověřovány, přičemž strukturní biologie hraje klíčovou roli v jejich dalším zdokonalení. Cílem je vyvinout ligand s vysokou afinitou a specifitou, který by se mohl stát účinným léčivem. Následuje optimalizace těchto látek z hlediska chemie a farmakologie. Celý tento proces je ilustrován na příkladech z nedávné minulosti, jako jsou kinasy lipidů, stimulator interferonových genů (STING) a virové methyltransferasy.

Klíčová slova: antivirotika, kinasa lipidů, STING, methyltransferasa, virus

### Obsah

1. Úvod
2. Lipidové kinas
3. Virové methyltransferasy modifikující čepičky RNA  
3.1. Inhibitory koronavirových methyltransferas
4. STING, vrozená imunita a poxviry  
4.1. Poxviróvé methyltransferasy a jejich inhibitory
5. Budoucí vývoj

### 1. Úvod

Strukturní biologie hraje stále větší roli v návrhu léčiv. Krystalografie, kryo-elektronová mikroskopie (kryo-EM) a nukleární magnetická rezonance (NMR) se využívají k získávání struktur biomakromolekul, zejména proteinů a jejich komplexů. Tyto experimentálně získané struktury se dále používají ve virtuálním prohledávání velkých knihoven látek, které často obsahují desítky milio-

nů sloučenin, za účelem nalezení vhodných kandidátů ovlivňujících (nejčastěji inhibujících) funkci cílového proteinu. Aktivity takto nalezených látek jsou poté experimentálně ověřovány a látky jsou dále chemicky a farmakologicky optimalizovány. Tento postup představuje základ pro racionální návrh nových léčiv.

Zde se zaměříme na roli strukturní biologie ve zdokonalování ligandů za účelem získání užitečných chemických nástrojů nebo sloučenin charakterizovaných vysokou afinitou a specifitou, které budou vhodnými kandidáty na budoucí léčiva. Tento proces bude ilustrován medicínskými významnými příklady, jako jsou kinasy lipidů, které jsou nezbytné pro replikaci určitých virů, stimulator interferonových genů (STING), který je klíčovým hráčem vrozené imunity, a virové methyltransferasy, které viry používají k oklamání vrozené imunity. Vysoce specifické ligandy pro tyto proteiny byly nedávno vyvinuty na ÚOCHB i s pomocí strukturní biologie.



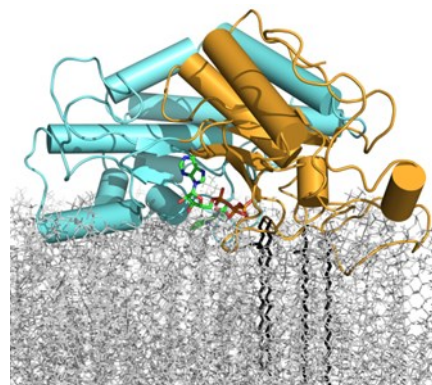
*Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D. vystudoval obor fyzikální chemie a obor molekulární biologie a genetiky na přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, kde v roce 2008 získal i titul Ph.D. pod vedením profesora Obšila. Čtyři roky pracoval na americkém Národním ústavu zdraví (NIH) v Bethesda, kde se věnoval mimo jiné výzkumu buněčného transportu a viru HIV pomocí metod strukturní biologie, jako je makromolekulární krystalografie. Od roku 2012 vede skupinu zaměřující se na výzkum RNA virů a vývoj léčiv na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR. Publikoval přes 100 prací v odborných časopisech.*

## 2. Lipidové kinasy

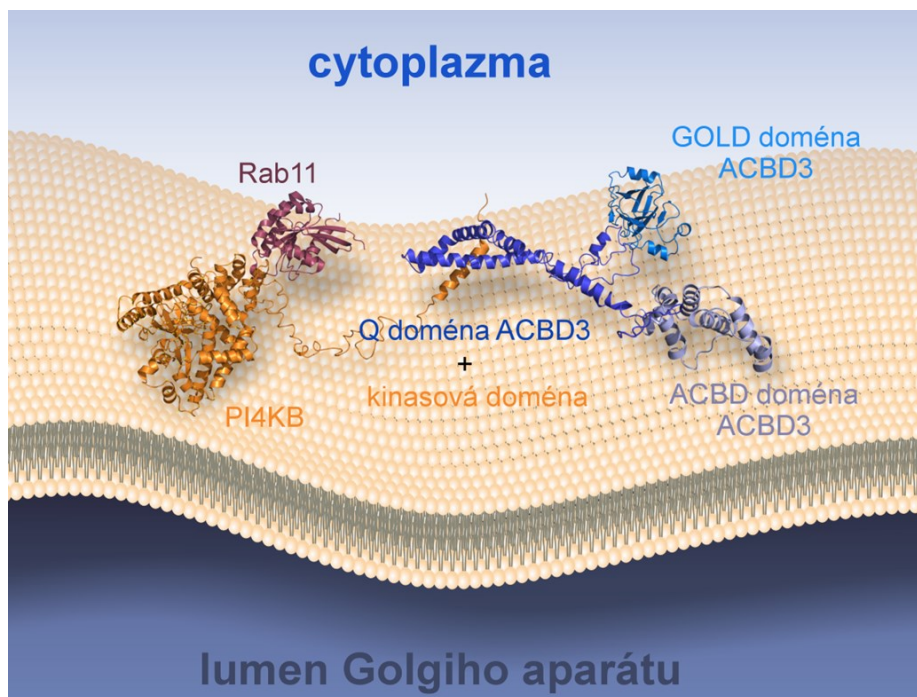
Lipidové kinasy jsou zodpovědné za tvorbu fosforylovaných lipidů z jejich nefosforylovaných nebo méně fosforylovaných prekurzorů, čímž mění chemické složení a náboj cílové membrány. Kromě toho slouží fosforylační stav některých lipidů, jako jsou fosfatidylinositolfosfáty (PIP), jako „biologická adresa“ pro danou membránu, která je rozhodující pro řízení kritických buněčných procesů. Modulaci fosforylačního stavu PIP řídí kinasy lipidů řadu buněčných dějů, včetně buněčného růstu, diferenciacce a vnitrobuněčného transportu. Kromě toho se tyto kinasy podílejí na regulaci dynamiky membrán a transportu vezikulů. PIP jsou klíčové lipidy produkované třídou kinas lipidů zvaných fosfatidylinositolkinasy. Některé PIP také fungují jako druzí poslové při přenosu signálu. Jak již bylo uvedeno výše, nejdůležitější funkcí PIP je schopnost pomáhat definovat identitu různých buněčných membrán. Zde je uvedeno několik příkladů: plazmatická membrána je bohatá na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2), endosomy na fosfatidylinositol-3-fosfát (PI3P) a membrána Golgiho aparátu na fosfatidylinositol-4-fosfát (PI4P) (podrobný přehled viz cit.<sup>1</sup>). Tyto PIP vznikají působením specifických kinas. PI4P je produkovan fosfatidylinositol-4-kinasami (PI4K) na povrchu membrány (obr. 1). Lidé mají čtyři tyto enzymy: i) PI4KA, která produkuje PI4P na plazmatické membráně, kde je PI4P dále fosforylován na PIP2; ii) PI4KB, která je zodpovědná za syntézu ~50 % zásob PI4P na membránách Golgiho systému; iii) PI4K2A, která syntetizuje zbylých 50 % PI4P Golgiho

systemu a také produkuje PI4P na endosomech při jejich zrání; iv) PI4K2B, která je po většinu času v neaktivní formě v cytosolu a její fyziologická role je stále nejasná<sup>2,3</sup>.

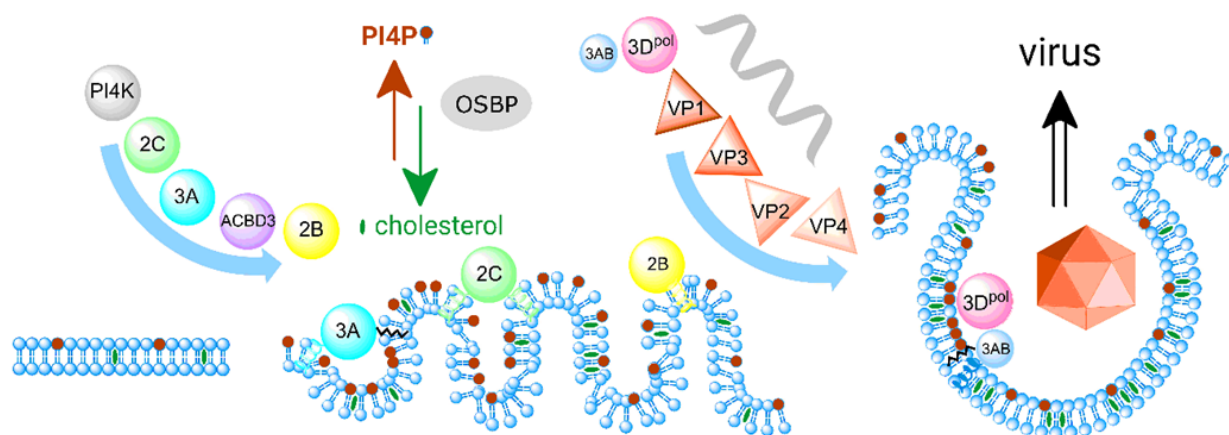
Mnoho lékařsky významných virů, jako je virus hepatitidy C (HCV) a mnoho různých virů ze skupiny pikornavirů, např. enteroviry, poliovirus (virus dětské obrny), coxsackieviry nebo rhinoviry, „zneužívá“ PI4K, protože ke své replikaci vyžadují membrány bohaté na PI4P. Ukázalo se, že téměř všechny tyto viry využívají PI4KB, s výjimkou několika kmenů HCV, které využívají PI4KA (cit.<sup>5,6</sup>). Tato skutečnost postavila PI4K do centra vědecké



Obr. 1. **Struktura PI4K2A na membráně.** Kinasa je zakotvena na lipidové dvojvrstvě. Kotvící zbytky kyseliny palmitové jsou modelovány. ATP se nachází v blízkosti membránových N- a C-laloků, které jsou zbarveny oranžově, resp. azurově



Obr. 2. **Proteinový komplex kotvící PI4KB na membránu.** Model založený na strukturálních datech (Klima a spol.)<sup>4</sup>



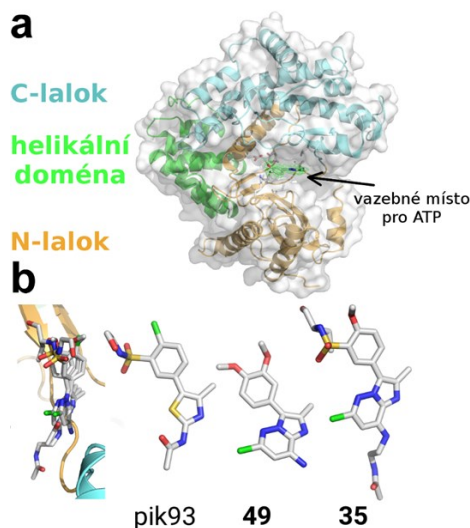
Obr. 3. **Schéma místa virové replikace.** Různé virové proteiny remodelují membránu a rekrutují PI4KB, což vede ke vzniku membrány bohaté na PI4P a cholesterol. Následně virová polymerasa, 3D<sup>pol</sup>, syntetizuje nové molekuly RNA, které jsou pak zabaleny do virionů

ho zkoumání a struktury těchto enzymů byly brzo dostupné<sup>7–11</sup>. Byla charakterizována také architektura heterokomplexů kinasu PI4KB. Ta tvoří komplex s proteinem ABCD3, který sídlí v Golgiho aparátu<sup>12</sup> a je důležitý pro membránovou lokalizaci PI4KB – ACBD3 připoutává PI4KB k membráně Golgiho aparátu. Doména Q (bohatá na glutamin) ACBD3 se váže na N-koncový helix PI4KB s nanomolární afinitou<sup>4</sup>. Později se ukázalo, že PI4KB vytváří vysoce flexibilní heterokomplex PI4KB:Rab11:ACBD3 (obr. 2) a při fosforylaci PI4KB zahrnuje komplex také protein 14-3-3 (cit.<sup>13,14</sup>). Je zajímavé, že interakce s 14-3-3 je konzervována od kvasinek až po člověka<sup>15</sup>.

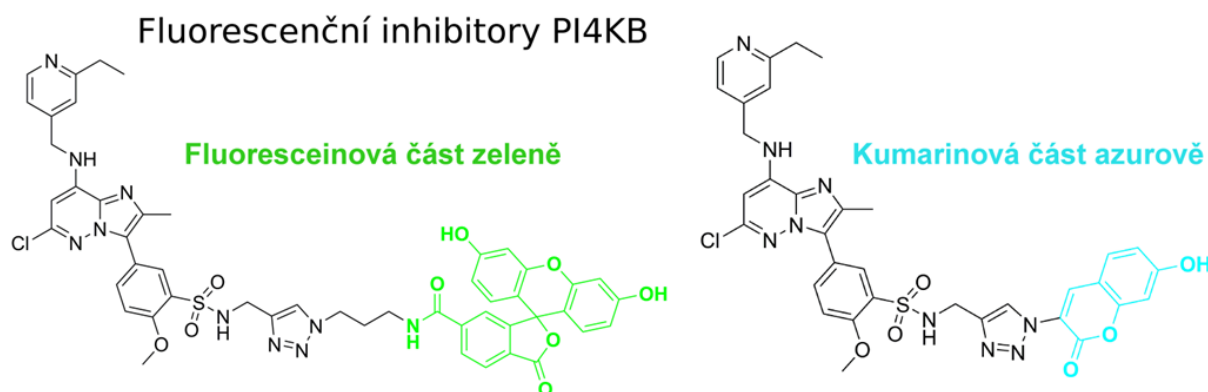
Pikornaviry manipulují s těmito komplexy založenými na PI4KB. Stačí jim k tomu malý protein 3A. Tento protein 3A interaguje s ACBD3 a je schopen rekrutovat kinasu PI4KB na membránu (+RNA viry se vždy replikují na membránové organele, obr. 3)<sup>12,16</sup>. Strukturální analýza ukázala, že proteiny 3A z různých pikornavirů se omotávají kolem GOLD domény proteinu ACBD3. Jelikož 3A má transmembránový helix, dochází k ukotvení ACBD3 na cílové membráně a následnému navázání PI4KB. Předpokládalo se, že enzymový produkt PI4KB, lipid PI4P, specificky rekrutuje virové polymerasy<sup>17</sup>. Později se však ukázalo, že za vazbu virových polymeras na membránu nestojí konkrétně PI4P, ale spíše záporný náboj obecně<sup>18</sup>. Další významnou vlastností PI4P je jeho schopnost být vyměněn za jiný lipid, např. fosfatidylserin (PS)<sup>19–22</sup> nebo cholesterol<sup>23</sup>. Tento příklad ilustruje další důvod, proč některé viry „unášejí“ PI4KB. Konkrétně se jedná o viry, které vyžadují pro svou replikaci membránu s vysokým obsahem cholesterolu<sup>24</sup>.

Když byla PI4KB identifikována jako cíl pro vývoj antivirových, začalo hledání jejích inhibitorů. Široce používaný pik93 je nanomolárním inhibitorem PI4KB, avšak postrádá selektivitu a inhibuje i jiné kinasy, například PI3K. Na základě informací publikovaných o vysoce účinném inhibitoru T-00127-HEV1 jsme spoluvinuli selektivní sloučeniny proti PI4KB (cit.<sup>25</sup>). Tyto sloučeniny již

vykazovaly aktivitu v submikromolárním rozmezí v enzymových testech *in vitro* a v mikromolárním rozmezí proti coxsackieviru B3 (CVB3), lidskému rhinoviru (HRV) a viru hepatitidy C genotypu 1b (HCV 1b)<sup>26</sup>. Důležitá je skutečnost, že krystalové struktury jak pik93, tak sloučeniny **49** (cit.<sup>26</sup>) vázané na PI4KB byly k dispozici<sup>7,26</sup>. Tyto strukturální informace byly využity a byly navrženy hybridní sloučeniny, jako je např. **35** (obr. 4) nesoucí vlastnosti obou mateřských sloučenin, tedy pik93 a **49** (obr. 4). Funkční a strukturální charakterizace odhalila, že způsob



Obr. 4. **PI4KB a její inhibitory.** a) Kinasová doména PI4KB se skládá z N-koncového laloku (oranžová) a C-koncového laloku (azurová), které jsou v těsném kontaktu se šroubovicovou doménou (zelená). Vazebné místo pro ATP se nachází mezi N- a C-koncovým lalokem. b) Zleva doprava: superpozice inhibitorů pik93, **49** a **35** v místě vazby ATP; struktury PIK93, **49** a **35**. Barevně rozlišeno podle atomů, přičemž uhlík je bílý, dusík modrý, síra žlutá a kyslík červený



Obr. 5. **Fluorescenční inhibitory PI4KB.** K vysoce specifickému inhibitoru PI4KB byly kovalentně připojeny fluorofory fluorescein (znázorněno zeleně) nebo kumarin (znázorněno modře)

vazby se podle očekávání podobá způsobu vazby pik93 a sloučeniny **49** (obr. 4). Zároveň byla potvrzena aktivita v jednociferném nanomolárním rozsahu v enzymových testech a silná ( $EC_{50} < 100$  nM pro všechny sloučeniny) antivirová aktivita proti CVB3, HRV1 a HCV 1b (cit.<sup>27</sup>). Důležitým poznatkem je, že tyto sloučeniny prokázaly výjimečnou specifitu vůči PI4KB, přičemž neukázaly žádnou reziduální aktivitu proti celému spektru lidského kinomu, tedy vůči všem kinasám přítomným v lidských buňkách<sup>27</sup>.

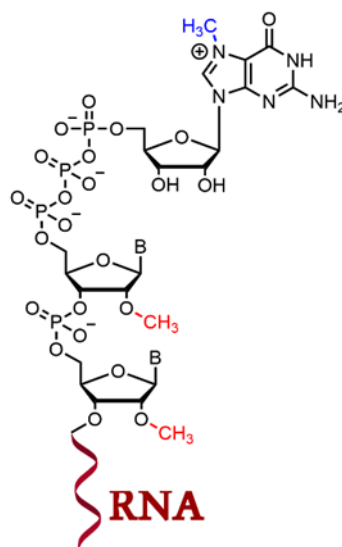
Dalším významným využitím, které strukturální informace umožňují, je specifická úprava studovaných molekul. Krystalové struktury PI4KB s několika inhibitory odhalily pozice uvnitř inhibitoru, kam lze připojit funkční skupinu, aniž by došlo k narušení vazby ligandu. V tomto případě byl k sulfonamidové části připojen fluorofor (obr. 5), čímž vzniklo specifické fluorescenční značení PI4K, které lze použít ke stanovení hodnot  $K_d$  *in vitro* nebo při zobrazování živých buněk<sup>28</sup>.

### 3. Virové methyltransferasy modifikující čepičky RNA

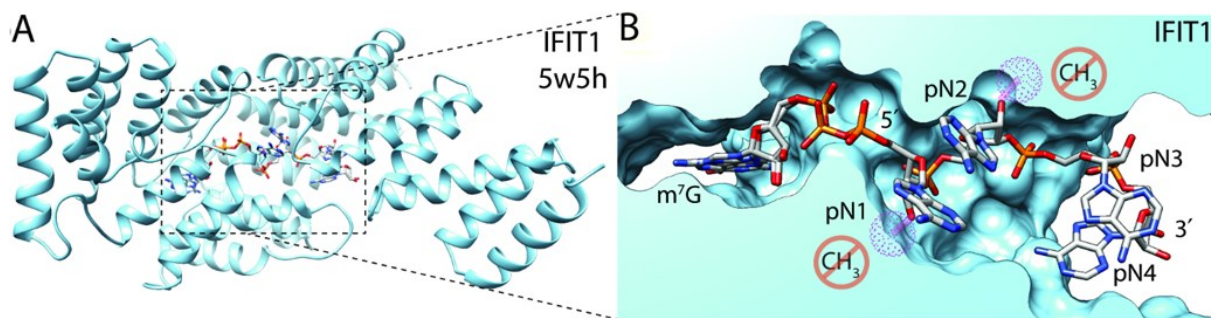
Lidská mRNA nese na svém 5' konci tzv. čepičku. Tato čepička je chemicky tvořena *N*7-methylovanou guaninovou bází, která je spojena s 5' koncem RNA pomocí trifosfátového mostu. Tato struktura se označuje jako cap-0 (z anglického cap – čepička). U vyšších eukaryot, včetně člověka, může být ribosový kruh prvního a druhého nukleotidu RNA methylován také v 2' poloze ribosy, čímž vzniká cap-1 (první ribosový kruh methylováný) a cap-2 (první a druhý kruh methylováný) (obr. 6). Tyto čepičky RNA jsou důležité pro stabilitu RNA, export RNA z buněčného jádra a jsou také nezbytné pro účinnou translaci RNA (cit.<sup>29</sup>). Nedávno byly popsány další vzácné nekanonické čepičky, jako jsou NAD nebo dinukleosidové polyfosfáty<sup>30,31</sup>, ale jejich biologický význam, zejména u virů, je třeba ještě určit<sup>32,33</sup>.

Methylace RNA-čepiček byla alespoň částečně objevena díky virům<sup>34</sup>. Brzy se ukázalo, že téměř všechny rodiny virů musí chránit 5' konec své RNA. Ne všechny viry však čepičku používají; například pikornaviry kovalentně připojují svůj protein 3B (známý také jako Vpg, viral protein genome-linked), který slouží jako primer – přesněji řečeno proteinový primer – pro syntézu pozitivního (+) i negativního (–) vlákna RNA (cit.<sup>35</sup>).

Podobně jako u člověka je i u virové RNA (vRNA) čepička významná pro translaci virové RNA, přinejmenším u některých virových rodin a v určitých fázích virové infekce. Dalším významným důvodem pro opatření vRNA čepičkou je nutnost obrany úspěšného viru proti vrozené imunitě<sup>37</sup>. Ve skutečnosti existuje mnoho receptorů pro



Obr. 6. **RNA opatřená methylovanou čepičkou.** Methylová skupina na guaninové bázi je zvýrazněna modře, methylové skupiny na prvním a druhém ribosovém kruhu jsou zvýrazněny červeně. B značí bázi



Obr. 7. Rozpoznávání neúplně methylované čepičky RNA zprostředkované proteinem IFIT1. a) Krystalová struktura IFIT1 s RNA cap-0 založená na PDB ID 5w5h. b) Detail vazebného místa IFIT1 s vyznačením pozic, kde by methylované kruhy ribosy vytvářely sterické kolize. Převzato a upraveno z Nencka a spol.<sup>36</sup>

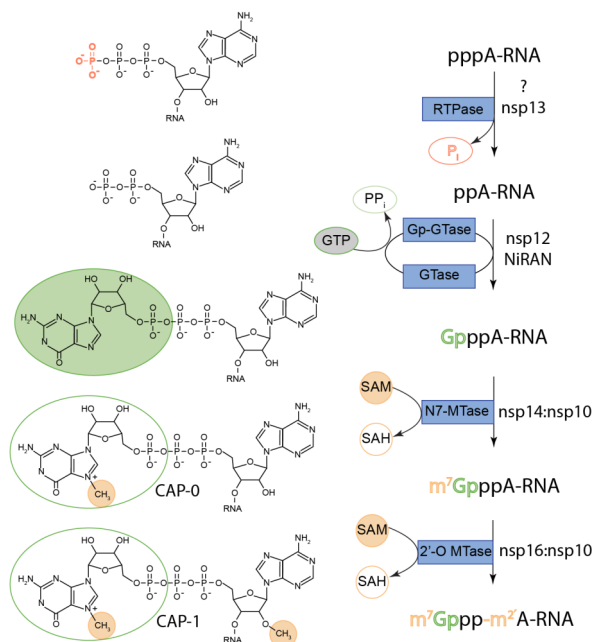
rozpoznávání pathogenních vzorů (PRR, z angl. pathogen recognition receptor), které mohou detekovat vRNA, včetně RNA bez čepičky či RNA s neúplnou čepičkou. Například interferonem indukované proteiny s tetratripeptidovými repetitivy (IFIT) rozpoznávají vRNA a vážou se na ni<sup>38</sup> a inhibují tak translaci a replikaci viru (obr. 7). Dalším příkladem je RIG-I (z angl. retinoic acid-inducible gene I), který je kritickým PRR ve vrozeném imunitním systému, odpovědný za detekci vRNA. RIG-I je aktivován v přítomnosti dvouvláknové RNA a spouští signální kaskádu, která vede k produkci interferonů typu I a prozánětlivých cytokinů, což je nezbytné pro účinnou protivirovou imunitní odpověď<sup>39</sup>.

Některé viry, zejména virus chřipky, „kradou“ RNA čepičky z buněčných RNA a vážou je na vRNA (cit.<sup>40</sup>). Většina virů, včetně nebezpečných rodin virů s pandemickým potenciálem, jako jsou flaviviry, poxviry a koronaviry, však má vlastní enzymy pro syntézu čepiček a enzymová dráha jejich syntézy je podobná lidské (obr. 8). Mezi tyto enzymy patří *N*7- a 2'-*O*-methyltransferasy (MTasy) a mohou být kovalentně spojeny s polymerasou<sup>41</sup> nebo s ní kolokalizovat<sup>42</sup>. Proto je pravděpodobné, že inhibice virových MTas by učinila virus zranitelným vůči vrozené imunitní odpovědi, což by mohlo vést k odstranění viru nebo přinejmenším k asymptomatické infekci.

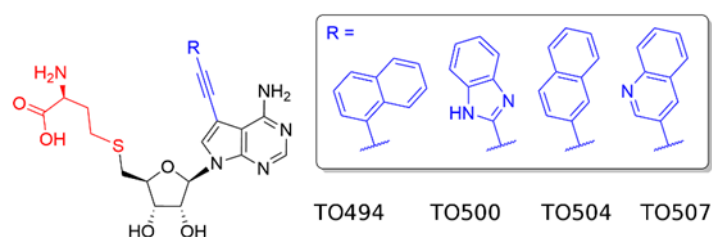
### 3.1. Inhibitory koronavirových methyltransferas

Koronaviry, včetně nechvalně známého SARS-CoV-2, mají dvě RNA MTasy: nsp14, která methyloje guaninovou bázi v poloze *N*7 za vzniku cap-0, a nsp16, která v komplexu se svým aktivačním proteinem nsp10 methyloje první ribosový kruh počátečního nukleotidu RNA, což vede ke vzniku cap-1. Oba tyto enzymy jsou považovány za slibné cíle pro antivirotika, což vedlo k významnému pokroku v návrhu inhibitorů od začátku pandemie COVID-19 v naší i dalších laboratořích<sup>33,43–58</sup>. Významnou roli sehrála strukturální biologie. Použili jsme homologní model SARS-CoV-2 nsp14, který vykazuje velkou podobnost se SARS-CoV nsp14 (v té době ještě nebyla k dispozici krystalová struktura SARS-CoV-2 nsp14), což vedlo k objevu nových derivátů *S*-adenosylhomocysteinu (SAH) s modifikacemi na adeninové nukleobázi. Tyto sloučeniny byly syntetizovány a testovány *in vitro*, přičemž byl odhalen jejich pozoruhodný inhibiční potenciál v jednociferném nanomolárním rozsahu vůči výše zmiňovanému enzymu. Naše modely interakcí těchto inhibitorů s nsp14 účinně vysvětlují, jak aromatická složka v poloze 7 u analogů SAH přispívá k jejich aktivitě<sup>50</sup> (obr. 9).

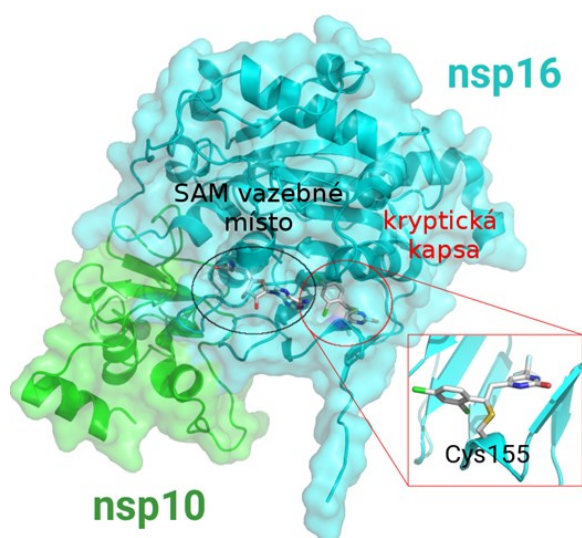
Podobně výpočetní studie naznačila existenci kryptických kapes v koronavirové MTase nsp16 (cit.<sup>58</sup>). Nejprve byla pomocí vysoce výkonného screeningu identifikována sloučenina **5a**, která byla následně krystalizována



Obr. 8. Syntéza čepičky RNA u koronaviřů. Převzato a upraveno z Nencka a spol.<sup>36</sup>



Obr. 9. Inhibitory MTasy SARS-CoV-2 nsp14 odvozené od SAH (z angl. *S*-Adenosyl-*L*-homocysteine). Velké aromatické substituenty v poloze 7-deaza jsou zvýrazněny modře, aminokyselinová část je zvýrazněna červeně



Obr. 10. Kryptická kapsa v proteinu SARS-CoV-2 nsp16. Vazebné místo *S*-adenosylmethioninu a kryptická kapsa jsou zvýrazněny. Detailní pohled na kryptickou kapsu ukazuje kovalentní vazbu mezi malou inhibiční sloučeninou **5a** a zbytkem Cys155

s komplexem nsp16/nsp10. Pozoruhodné je, že byla pozorována v kapse v těsné blízkosti aktivního místa enzymu (obr. 10). S využitím této strukturní informace byly vyvinuty deriváty, které rovněž působily jako alosterické inhibitory<sup>59</sup>.

#### 4. STING, vrozená imunita a poxviry

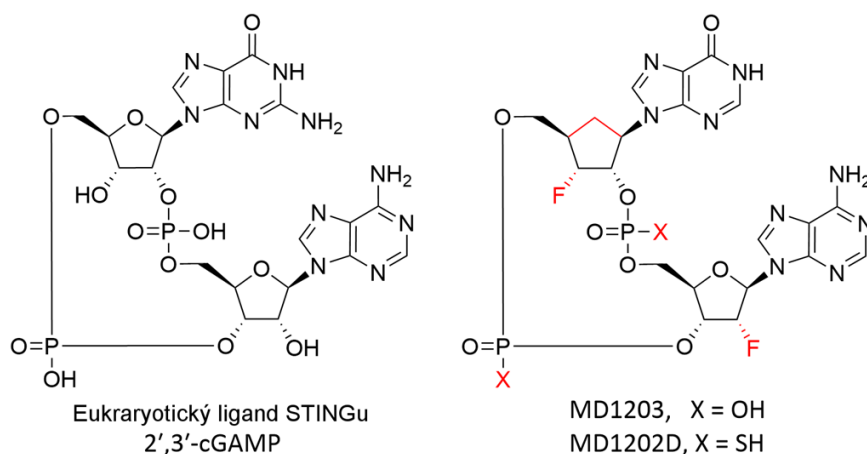
V poslední době se na všech kontinentech rychle rozšířil nový virus opičích neštovic neboli mpox virus (MPXV)<sup>60</sup>. Tato epidemie pravděpodobně souvisí s ukončením očkování proti pravým neštovicím, které bylo účinné nejen proti pravým neštovicím, ale i proti jiným poxvirům, což zabránilo celosvětovému šíření MPXV. Nicméně rychlé šíření viru MPXV ukazuje, jak snadno může vznik-

nout nová pandemie, která by ohrozila naše životy i světovou ekonomiku.

Poxviry jsou DNA viry, které se replikují v cytoplazmě. Jejich rozsáhlý genom kóduje celý mechanismus replikace DNA a zpracování RNA, včetně mechanismu pro modifikaci virové RNA čepičkou<sup>61,62</sup>. DNA by se v cytoplazmě neměla vyskytovat a její přítomnost v ní svědčí o infekci DNA virem. Dvouvláknová (dsDNA) je detekována cGAS-STING signální drahou. Protein cGAS (syntasa cyklického GMP-AMP nebo cGAMP) detekuje dsDNA a syntetizuje cyklický dinukleotid cGAMP, který aktivuje protein STING (stimulátor interferonových genů)<sup>63</sup>. To následně vede k expresi interferonem indukovaných genů, což v buňce vyvolá antivirový stav. Jako protiváhu této dráze kódují poxviry neobvyklou nukleasu zvanou poxin, která rychle degraduje cGAMP (cit.<sup>64,65</sup>). V poslední době bylo na ÚOCHB vyvinuto mnoho agonistů STING (cit.<sup>66–74</sup>), z nichž některé jsou odolné vůči štěpení poxinem (obr. 11).

##### 4.1. Poxirové methyltransferasy a jejich inhibitory

Poxirové MTasy jsou rovněž považovány za *bona fide* cíle pro léčiva. Krystalová struktura 2'-*O*-MTasy MPXV, VP39, odhalila dutinu v těsné blízkosti adeninové báze *S*-adenosylmethioninu (SAM), kterou lze využít k přípravě účinných inhibitorů<sup>75</sup>. Byly použity dva přístupy: i) vyhledávání inhibitorů VP39 ve velké knihovně látek a ii) návrh inhibitorů založený na krystalové struktuře VP39. Oba přístupy přinesly submikromolární inhibitory, které využívaly tuto dutinu, a je zajímavé, že některé z těchto inhibitorů, např. TO507 (obr. 9), měly stejnou chemickou strukturu jako nanomolární inhibitory proti SARS-CoV-2 MTase nsp14 (cit.<sup>75</sup>). Tyto výsledky ilustrují, že stejná sloučenina může cílit na různé enzymy (*N7*-a 2'-*O*-MTase) z nepříbuzných virů. Všechny tyto inhibitory obsadily vazebné místo pro SAM a tudíž nemohou ovlivňovat vazbu RNA na enzym VP39 (cit.<sup>76</sup>). Pokusy s živým virem v naší laboratoři na úrovni biologického zabezpečení stupně 3 ukázaly, že tyto sloučeniny účinně blokují replikaci viru MPXV (cit.<sup>77</sup>).



Obr. 11. **Ligandy STING.** Vlevo: přirozený ligand cGAMP. Vpravo: Příklad ligandů připravených na ÚOCHB, které jsou odolné vůči štěpení poxinem

## 5. Budoucí vývoj

Strukturální biologie bude mít při navrhování inhibitorů i nadále zásadní význam. Očekává se však významný posun směrem k *in silico* metodám díky pokroku v oblasti umělé inteligence (AI). AlphaFold 2 již vyniká v předpovídání struktury proteinů a v blízké budoucnosti se očekává nástup AI, která dokáže přesně předpovídat vazbu ligandů. Takové umělé inteligence by byly přínosné zejména tam, kde je generování experimentálních krystalových struktur velmi náročné. Například zatímco identifikace inhibitorů virových polymeras, ať už jakoukoli metodou, je poměrně přímočará<sup>78–81</sup>, získání jejich krystalové struktury může být velmi náročné, protože je třeba připravit krystaly ternárního komplexu, který obsahuje také RNA a její sekvence musí být optimalizována. V takových situacích jsme se dříve často spolehnali na modely odvozené z počítačových simulací<sup>82</sup>.

Dalším příkladem jsou vnitřně neuspořádané proteiny, nebo takové, které obsahují dobře složené domény propojené neuspořádanými segmenty, jako je například koronavirový protein N. Strukturální biologie je schopna tyto proteiny charakterizovat, často pomocí kombinace metod, jako je rozptyl rentgenového záření pod malým úhlem (SAXS) a počítačových simulací<sup>83</sup> – jak bylo nedávno ukázáno na proteinu N (cit.<sup>84</sup>) – což vede k získání tisíců strukturálních modelů. Tyto struktury jsou následně seskupeny do několika skupin, neboli klastrů. V této oblasti by umělá inteligence mohla hrát neocenitelnou roli, a to identifikací klastru vhodného pro vazbu léčiva a návrhem sloučeniny, která by byla schopna „uzamknout“ protein v fyziologicky neaktivní konformaci.

Stejně jako v mnoha jiných vědních oborech se očekává, že AI změní a zdokonalí tradiční postup navrhování léčiv na základě struktury. Nicméně experimentální struk-

tury budou vždy nezbytné k ověření výsledků *in silico*; nikdo by se nepouštěl do nákladného vývoje léků pouze na základě předpovědi umělé inteligence s 90 až 95% přesností.

*Tento výzkum byl financován z projektu Národního ústavu virologie a bakteriologie (program EXCELES, č. projektu LX22NPO5103) – financovaného Evropskou unií – Next Generation EU. Děkujeme také RVO: 61388963.*

## LITERATURA

1. Balla T.: *Physiol. Rev.* 93, 1019 (2013).
2. Balla A., Balla T.: *Trends Cell Biol.* 16, 351 (2006).
3. Boura E., Nencka R.: *Exp. Cell Res.* 337, 136 (2015).
4. Klima M. a 14 spoluautorů: *Sci. Rep.* 6, 23641 (2016).
5. Altan-Bonnet N., Balla T.: *Trends Biochem. Sci.* 37, 293 (2012).
6. McPhail J. A., Burke J. E.: *Traffic* 24, 131 (2023).
7. Burke J. E., Inglis A. J., Perisic O., Masson G. R., McLaughlin S. H., Rutaganira F., Shokat K. M., Williams R. L.: *Science* 344, 1035 (2014).
8. Baumlova A. a 10 spoluautorů: *EMBO Rep.* 15, 1085 (2014).
9. Klima M., Baumlova A., Chalupska D., Hrebabecky H., Dejmeck M., Nencka R., Boura E.: *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 71, 1555 (2015).
10. Dornan G. L., Dalwadi U., Hamelin D. J., Hoffmann R. M., Yip C. K., Burke J. E.: *J. Mol. Biol.* 430, 3129 (2018).
11. Lees J. A. a 10 spoluautorů: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13720 (2017).
12. Sasaki J., Ishikawa K., Arita M., Taniguchi K.:

- EMBO J. 31, 754 (2012).
13. Chalupska D., Eisenreichova A., Rozycki B., Rezabkova L., Humpolickova J., Klima M., Boura E.: J. Struct. Biol. 200, 36 (2017).
  14. Chalupska D., Rozycki B., Humpolickova J., Faltova L., Klima M., Boura E.: Sci. Rep. 9, 567 (2019).
  15. Eisenreichova A., Klima M., Boura E.: Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun. 72, 799 (2016).
  16. Greninger A. L., Knudsen G. M., Betegon M., Burlingame A. L., Derisi J. L.: J. Virol. 86, 3605 (2012).
  17. Hsu N. Y. a 13 spoluautorů: Cell 141, 799 (2010).
  18. Dubankova A., Humpolickova J., Klima M., Boura E.: Sci. Rep. 7, 17309 (2017).
  19. Chung J., Torta F., Masai K., Lucast L., Czapla H., Tanner L. B., Narayanaswamy P., Wenk M. R., Nakatsu F., De Camilli P.: Science 349, 428 (2015).
  20. Eisenreichova A., Rozycki B., Boura E., Humpolickova J.: Front. Mol. Biosci. 8, 747601 (2021). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.747601>.
  21. Eisenreichova A., Klima M., Anila M. M., Koukalova A., Humpolickova J., Rozycki B., Boura E.: Cells 12, 1974 (2023). <https://doi.org/10.3390/cells12151974>.
  22. Eisenreichova A., Humpolickova J., Rozycki B., Boura E., Koukalova A.: Biochimie 215, 42 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.09.003>.
  23. Antonny B., Bigay J., Mesmin B.: Annu. Rev. Biochem. 87, 809 (2018).
  24. Ishikawa-Sasaki K., Nagashima S., Taniguchi K., Sasaki J.: J. Virol. 92, (2018). <https://doi.org/10.1128/jvi.01952-17>.
  25. Arita M., Kojima H., Nagano T., Okabe T., Wakita T., Shimizu H.: J. Virol. 85, 2364 (2011).
  26. Mejdrova I. a 16 spoluautorů: J. Med. Chem. 58, 3767 (2015).
  27. Mejdrova I. a 18 spoluautorů: J. Med. Chem. 60, 100 (2017).
  28. Humpolickova J., Mejdrova I., Matousova M., Nencka R., Boura E.: J. Med. Chem. 60, 119 (2017).
  29. Ramanathan A., Robb G. B., Chan S. H.: Nucleic Acids Res. 44, 7511 (2016).
  30. Hudecek O., Benoni R., Reyes-Gutierrez P. E., Culka M., Sanderova H., Hubalek M., Rulisek L., Cvacka J., Krasny L., Cahova H.: Nat. Commun. 11, 1052 (2020).
  31. Mattay J.: Wiley Interdiscip. Rev.: RNA 13, e1730 (2022).
  32. Potuznik J. F., Cahova H.: mBio 11, (2020). <https://doi.org/10.1128/mbio.02131-20>.
  33. Benoni R., Krafcikova P., Baranowski M. R., Kowalska J., Boura E., Cahova H.: Viruses 13, 1722 (2021).
  34. Abdelaziz O. S., Waffa Z.: Rev. Med. Virol. 30, e2118 (2020).
  35. Paul A. V., Wimmer E.: Virus Res. 206, 12 (2015).
  36. Nencka R., Silhan J., Klima M., Otava T., Kocek H., Krafcikova P., Boura E.: Nucleic Acids Res. 50, 635 (2022).
  37. Nelemans T., Kikkert M.: Viruses 11, 961 (2019).
  38. Franco J. H., Chattopadhyay S., Pan Z. K.: Viruses 15, 342 (2023).
  39. Thoresen D., Wang W., Galls D., Guo R., Xu L., Pyle A. M.: Immunol. Rev. 304, 154 (2021).
  40. De Vlugt C., Sikora D., Pelchat M.: Viruses 10, 641 (2018).
  41. Dubankova A., Boura E.: Antiviral Res. 169, 104536 (2019).
  42. Horova V., Landova B., Hodek J., Chalupsky K., Krafcikova P., Chalupska D., Duchoslav V., Weber J., Boura E., Klima M.: Viruses 13, 1487 (2021).
  43. Aggarwal A., Kottur J.: Res. Sq. (2022). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1370473/v1>.
  44. Ahmed-Belkacem R. a 12 spoluautorů: J. Med. Chem. 65, 6231 (2022).
  45. Ahmed-Belkacem R., Sutto-Ortiz P., Guiraud M., Canard B., Vasseur J. J., Decroly E., Debart F.: Eur. J. Med. Chem. 201, 112557 (2020).
  46. Bobileva O. a 13 spoluautorů: ACS Med. Chem. Lett. 12, 1102 (2021).
  47. Dostalík P., Krafcikova P., Silhan J., Kozic J., Chalupska D., Chalupsky K., Boura E.: J. Virol. 95, (2021). <https://doi.org/10.1128/jvi.00463-21>.
  48. Kasprzyk R., Spiewla T. J., Smietanski M., Golojuch S., Vangeel L., De Jonghe S., Jochmans D., Neyts J., Kowalska J., Jemielity J.: Antiviral Res. 193, 105142 (2021).
  49. Krafcikova P., Silhan J., Nencka R., Boura E.: Nat. Commun. 11, 3717 (2020).
  50. Otava T. a 11 spoluautorů: ACS Infect. Dis. 7, 2214 (2021).
  51. Pearson L. A., Green C. J., Lin D., Petit A. P., Gray D. W., Cowling V. H., Fordyce E. A. F.: SLAS Discov. 26, 749 (2021).
  52. Rosas-Lemus M., Minasov G., Shuvalova L., Inniss N. L., Kiryukhina O., Brunzelle J., Satchell K. J. F.: Sci. Signaling 13, (2020). <https://doi.org/10.1126/scisignal.abe1202>.
  53. Devkota K. a 19 spoluautorů: SLAS Discov. 26, (2021). <https://doi.org/10.1177/24725552211026261>.
  54. Khalili Yazdi A., Li F., Devkota K., Perveen S., Ghiabi P., Hajian T., Bolotokova A., Vedadi M.: SLAS Discov. 26, 757 (2021).
  55. Klima M. a 13 spoluautorů: Protein Science 31, e4395 (2022).
  56. Li F. a 14 spoluautorů: Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. 1867, 130319 (2023).
  57. Rona G. a 16 spoluautorů: Cell Death Differ. 29, 285 (2022).
  58. Vithani N., Ward M. D., Zimmerman M. I., Novak B., Borowsky J. H., Singh S., Bowman G. R.: Biophys. J. 120, 2880 (2021).
  59. Inniss N. L. a 23 spoluautorů: ACS Infect. Dis. 2023, 1918 (2023). <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00203>.
  60. Antinori S., Casalini G., Giacomelli A., Rodriguez-Morales A. J.: Infez. Med. 31, 269 (2023).



61. Yang Z., Gray M., Winter L.: *Cell Biosci.* 11, 96 (2021).
62. Meade N., DiGiuseppe S., Walsh D.: *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA* 10, e1515 (2019).
63. Hopfner K. P., Hornung V.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 501 (2020).
64. Eaglesham J. B., Pan Y. D., Kupper T. S., Kranzusch P. J.: *Nature* 566, 259 (2019).
65. Duchoslav V., Boura E.: *Arch. Virol.* 168, 192 (2023).
66. Dejmk M. a 12 spoluautorů: *Eur. J. Med. Chem.* 259, 115685 (2023).
67. Dejmk M. a 15 spoluautorů: *Structure* 30, 1146 (2022).
68. Novotna B. a 13 spoluautorů: *Biochemistry* 60, 3714 (2021).
69. Novotna B. a 19 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 62, 10676 (2019).
70. Pimkova Polidarova M. a 17 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 64, 7596 (2021).
71. Smola M., Birkus G., Boura E.: *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.* 75, 593 (2019).
72. Smola M. a 10 spoluautorů: *Angew. Chem.* 60, 10172 (2021).
73. Vavrina Z., Gutten O., Smola M., Zavrel M., Aliakbar Tehrani Z., Charvat V., Kozisek M., Boura E., Birkus G., Rulisek L.: *Biochemistry* 60, 607 (2021).
74. Vavrina Z. a 15 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 65, 14082 (2022).
75. Silhan J., Klima M., Otava T., Skvara P., Chalupska D., Chalupsky K., Kozic J., Nencka R., Boura E.: *Nat. Commun.* 14, 2259 (2023).
76. Skvara P., Chalupska D., Klima M., Kozic J., Silhan J., Boura E.: *Antiviral Res.* 216, 105663 (2023).
77. Zgarbova M., Otava T., Silhan J., Nencka R., Weber J., Boura E.: *Antiviral Res.* 218, 105714 (2023).
78. Dejmk M., Konkolova E., Eyer L., Strakova P., Svoboda P., Sala M., Krejcova K., Ruzek D., Boura E., Nencka R.: *Viruses* 13, 1585 (2021).
79. Konkolova E., Dejmk M., Hrebabecky H., Sala M., Boserle J., Nencka R., Boura E.: *Antiviral Res.* 182, 104899 (2020).
80. Konkolova E. a 11 spoluautorů: *Molecules* 27, 1894 (2022).
81. Milisavljevic N. a 14 spoluautorů: *ACS Infect. Dis.* 7, 471 (2021).
82. Sebera J., Dubankova A., Sychrovsky V., Ruzek D., Boura E., Nencka R.: *Sci. Rep.* 8, 11132 (2018).
83. Rozycki B., Boura E.: *J. Phys.: Condens. Matter* 26, 463103 (2014).
84. Rozycki B., Boura E.: *Biophys. Chem.* 288, 106843 (2022).

**E. Bouřa** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*): **Structural Biology in Antiviral Research – A Story Illustrated by the Tales of Lipid Kinases, STING and Viral Methyltransferases**

This article focuses on the role of structural biology in the development of small molecules that serve as protein ligands, which could potentially be used as drugs in the future. Experimental methods are utilized to obtain structural information about proteins, which then allow for virtual screening of extensive libraries of substances. The discovered ligands are further experimentally verified, with structural biology playing a crucial role in their refinement. The goal is to develop a ligand with high affinity and specificity, which could become an effective medicine. This is followed by the optimization of these substances from a chemical and pharmacological standpoint. The entire process is illustrated with examples from the recent past, such as lipid kinases, the stimulator of interferon genes (STING), and viral methyltransferases.

Full text English translation is available in the on-line version.

**Keywords:** antivirals, lipid kinase, STING, methyltransferase, virus

#### Acknowledgements

*This research was funded by the project the National Institute Virology and Bacteriology (Programme EXCELES, Project No. LX22NPO5103) – Funded by the European Union – Next Generation EU. RVO: 61388963 is also acknowledged.*



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.